

# Exploration de la diversité virale des ignames (*Dioscorea* spp.) cultivées de Madagascar et implications pour le contrôle de l'état sanitaire des plantations

Auteurs : Filloux-Denis<sup>1</sup>, Rajaonah-Mamy Tiana<sup>2</sup>, Jeannoda-Vololoniaina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CIRAD/UMR BGPI, TA A-54/K, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France. E-mail : filloux@cirad.fr

<sup>2</sup> Faculté des Sciences, Département de Biologie et Ecologie Végétales, BP 906, Antananarivo 101, Madagascar.

## Résumé

Pour accompagner le développement actuel de la culture des ignames à Madagascar, l'estimation de la prévalence et la caractérisation partielle des viroses présentes sur les ignames cultivées de parcelles paysannes de certaines régions productrices du pays ont été réalisées. Des tests PCR ont permis de détecter le *Dioscorea bacilliform virus* (badnavirus) sur les trois espèces d'ignames les plus fréquemment rencontrées, *Dioscorea alata*, *D. bulbifera* et *D. esculenta*. Le séquençage partiel de ces virus a permis de révéler la présence d'au moins dix souches distinctes réparties dans six des treize groupes génétiques de DBV. Plus problématique pour ses effets sur le rendement, une souche originale de Yam mild mosaic virus (potyvirus) a également été mise en évidence par RT-PCR sur une plante *D. alata*. Compte tenu de la présence constatée de virus, des mesures de sélection sanitaire, incluant destruction des plants infectés, sélection et indexation des plants-mères, mise en place de pépinières de multiplication sécurisées et schéma de quarantaine, sont proposées avant toute diffusion de matériel végétal vers des zones de culture indemnes ou introduction de variétés exotiques d'intérêt.

**Mots-clés :** Ignames, virus, détection virale, caractérisation moléculaire, sélection sanitaire

## Introduction

A Madagascar, l'igname est une ressource alimentaire marginale mais néanmoins importante pour les populations rurales. Elle contribue comme plante d'appoint à assurer leur alimentation pendant la période de soudure. Comme la plupart des plantes à tubercules, elle est moins sensible aux aléas climatiques et consomme moins d'eau que le riz pour lequel les malgaches sont très fortement dépendants. Historiquement importante à Madagascar, elle a cependant perdu progressivement de son importance face au développement d'autres plantes à racines plus faciles de culture mais malheureusement moins riches nutritionnellement, telles que le manioc et la patate douce. Cette dernière décennie, différents acteurs locaux (CTHA, Faculté des sciences d'Antananarivo, Fofifa) et internationaux (Cirad, Intercoopération suisse, Royal Botanic Gardens de Kew) ont diversement agi pour relancer la culture de l'igname à Madagascar, d'autant que cela pouvait limiter le prélèvement en milieu naturel, à fin alimentaire, des espèces d'ignames sauvages endémiques et en danger d'extinction.

Une étude récente (Rajaonah et al, 2010) a révélé que plusieurs espèces d'ignames sont cultivées à Madagascar. On retrouve majoritairement l'espèce *Dioscorea alata*, présente au moins sous forme de 12 morphotypes classés dans 3 groupes génétiques, et l'espèce *D. esculenta* ne présentant qu'un seul morphotype. L'espèce *D. bulbifera*, représentée par 2 morphotypes

(bulbille sphériques ou anguleuses) est plus marginalement consommée. Contrairement aux espèces endémiques qui font exclusivement l'objet de cueillettes, ces trois espèces cultivées ont toutes une origine sud-est asiatique et mélanésienne et ont été très probablement apportées par les peuples indonésiens lors des premières colonisations de la Grande île.

Peu d'informations existent sur l'état sanitaire des ignames cultivées à Madagascar. Parce qu'elles sont essentiellement propagées végétativement par plantation de fragments de tubercules ou de bulbilles, les ignames cultivées ont tendance à accumuler des viroses, entraînant progressivement une diminution de la production et de la qualité des tubercules récoltés (Thouvenel et Dumont, 1990). Souvent associées à d'autres bio-agresseurs (anthracnose, cochenilles, nématodes), elles peuvent entraîner la disparition totale de certains cultivars ou espèces sensibles. Les virus connus susceptibles d'infecter les espèces d'ignames tropicales sont principalement transmis par les insectes piqueurs tels que les pucerons et les cochenilles. Ils sont principalement au nombre de cinq (Brunt et al, 1989) : 1- Cucumber mosaic cucumovirus (CMV), 2- Dioscorea bacilliform badnavirus (DBV), 3- Dioscorea latent potexvirus (DLV), 4- Yam mosaic potyvirus (YMV), 5- Yam mild mosaic potyvirus (YMMV). Ces virus sont diversement répartis dans le monde et aucune information n'existe, à ce jour, sur leur présence à Madagascar, ni pour les espèces cultivées ni pour les espèces sauvages.

L'élimination des virus d'une plante est, cependant, délicate voire impossible sans manipulations précises comme, par exemple, la culture *in vitro* de méristèmes, et nécessite, dans la plupart des cas, la destruction des plants infectés. C'est pourquoi, il est important de se préoccuper, plus particulièrement, de la non-expansion des viroses à l'échelle locale et nationale, voire internationale.

Nous relatons ici les premières recherches menées dans le cadre du projet Corus 6020 (Valorisation de l'agrobiodiversité des ignames malgaches), visant à inventorier et caractériser les maladies virales susceptibles d'infecter les ignames de Madagascar et à proposer des mesures prophylactiques et des itinéraires techniques permettant de limiter leur impact sur la production.

## **Matériels et méthodes**

### *Zone de prospection et collecte du matériel végétal*

La collecte d'échantillons d'igname (feuilles) a été réalisée en avril 2010 sur la côte orientale (Brickaville, Mahanoro) de Madagascar dans une des principales zones de culture d'ignames. Différents villages où la culture de l'igname est pratiquée, ont été prospectés. La stratégie de collecte a consisté, dans un lieu donné, à prélever prioritairement une feuille sur les plantes présentant des symptômes viraux typiques ou douteux (mosaïque, déformation de feuille, tâche foliaire, chlorose,...), sur au moins une plante de chaque espèce présente, et, sur au moins une plante de chaque variété présente.

Des échantillons provenant de la collection de plantes vivantes du Département de Biologie et Ecologie Végétales (Faculté des Sciences, Antananarivo), elles-mêmes collectées en 2009 dans diverses régions productrices, ont également été prélevés.

Les feuilles ont été conditionnées à plat dans des sachets plastiques type Minigrip, fermés hermétiquement et vidés du maximum de leur air. Dès que possible, les feuilles ont été

conservées au frigo, à 4°C, sinon à température ambiante, pour une dizaine de jour maximum. De retour au laboratoire, les échantillons ont été immédiatement congelés tels quels à -20°C.

### *Détection des virus*

La détection des virus a été réalisée par PCR et RT-PCR en s'appuyant sur la méthodologie mise au point par Filloux et Girard (2006). Six espèces ou genres de virus ont été recherchés à savoir : tous les badnavirus, CMV, tous les potexvirus, tous les potyvirus et, en particulier, YMV et YMMV.

**Préparation des échantillons** : Les échantillons ont été préparés par broyage de 100 mg de feuille dans 1 ml de tampon carbonate (34,87 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ; pH 9,6) additionné de 2 % (p/v) PVP-40 et 1 % (p/v) Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Les broyats ont été centrifugés à 6000 g pendant 5 mn et 25 µl du surnageant ont été ajoutés dans des tubes PCR de 0,2 ml. Les tubes ont été incubés pendant une nuit à 4°C avant d'être rincés deux fois avec du PBS (0,137 M de NaCl, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,68 mM KCl, pH 7,4) contenant 0,05% (v/v) de Tween 20 et une fois avec de l'eau pure.

### **PCR, RT-PCR et analyse de l'amplification :**

**Badnavirus** : Les badnavirus ont été détectés par PCR en utilisant des amorces génériques badnavirus, BadnaFP et BadnaRP (Seal et Muller, 2007), et le kit HotStarTaq Master Mix (Qiagen) selon le protocole du fabricant. La concentration finale d'amorces dans le mélange PCR a été de 0,2 µM et la température d'annealing (Ta) était de 55°C. La taille théorique du produit d'amplification était de 579 pb.

**CMV** : CMV a été détecté par RT-PCR en utilisant des amorces CMV-1F et CMV-1R (De Blas et al, 1994) et le kit OneStep RT-PCR (Qiagen) selon le protocole du fabricant. La concentration finale d'amorces dans le mélange de RT-PCR était de 1 µM et Ta était de 55°C. La taille théorique du produit d'amplification était de 540 pb.

**Potexvirus** : Les potexvirus ont été détectés par RT-PCR en utilisant des amorces génériques potexvirus, Potex 2RC et Potex 5 (van der Vlugt et Berendsen, 2002), et le kit OneStep RT-PCR (Qiagen) selon le protocole du fabricant. La concentration finale d'amorces dans le mélange de RT-PCR était de 1 µM et Ta était de 51,5°C. La taille théorique du produit d'amplification était de 583 pb.

**Potyvirus** : Les potyvirus ont été détectés par RT-PCR en utilisant des amorces génériques potyvirus, Oligo 1n et Oligo 2n (Marie-Jeanne et al, 2000), et le kit OneStep RT-PCR (Qiagen) selon le protocole du fabricant. La concentration finale d'amorces dans le mélange de RT-PCR était de 0,4 µM et Ta était de 55°C. La taille théorique du produit d'amplification était de 327 pb.

**YMMV et YMV** : Ces deux potyvirus ont été détectés dans le même test par duplex RT-PCR en utilisant le kit OneStep RT-PCR (Qiagen) selon le protocole du fabricant et en ajoutant dans le mélange de RT-PCR les quatre amorces (YMMV CP 2F, YMMV UTR 1R, YMV CP 1F et YMV UTR 1R) décrits par Mumford et Seal (1997). La concentration finale d'amorces dans le mélange de RT-PCR a été de 0,2 µM et Ta était de 55°C. Les tailles théoriques des produits d'amplification respectifs étaient de 249 et 586 pb.

Vingt-cinq µl du mélange de PCR ou RT-PCR ont été ajoutés dans chaque tube et le cycle thermal a été lancé pour la transcription reverse de l'ARN (30 mn, 50°C), pour les virus à ARN uniquement, et pour l'amplification de l'ADN (15 mn à 95°C ; 35 cycles : 1 mn à 94°C, 1 mn à Ta, 1 mn à 72°C ; 10 mn à 72°C).

Dans tous les essais, les contrôles de l'eau ont été utilisés pour révéler les contaminations éventuelles des solutions tampons. Un témoin sain de *D. alata* obtenu à partir de semences véritables et maintenu dans une serre insect-proof a été utilisé comme contrôle négatif. De plus, pour chaque test, une plante d'igname infectée par le virus testé a été utilisée comme contrôle positif.

**Analyse de l'amplification :** Les produits amplifiés ont ensuite été soumis à une électrophorèse (100 V, 20 mn) à travers un gel d'agarose à 1,2% (p/v), coloré dans une solution de bromure d'éthidium (1 µg/ml) et visualisées sur transilluminateur UV.

**Clonage / séquençage :** Les produits de PCR aux poids moléculaires attendus ont été découpés du gel et purifiés avec le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Les produits purifiés ont été clonés au sein de bactéries *Escherichia coli* selon les instructions du kit pGEM-T® Easy Vector System (Promega). Après sélection par PCR des bactéries transformées et porteuses du produit de PCR, les plasmides ont été extraits des colonies bactériennes et purifiés avec le kit Quicklyse Miniprep (Qiagen), puis séquencés par méthode Sanger chez Beckman Coulter Genomics (Royaume-uni).

**Analyse des similarités :** Les données de séquençage ont été confrontées à la Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) par BlastN.

## Résultats

### Pratiques culturales

Dans la région visitée, les ignames rencontrées l'ont été principalement autour des habitations dans des jardins de case. Il s'agissait essentiellement de *D. alata* et *D. esculenta*, plus rarement *D. bulbifera*, moins consommée. Le nombre de plants est relativement faible et n'est jamais supérieur à une vingtaine environ. Les plantes grimpent plus ou moins spontanément sur des tuteurs naturels (arbre, case,...). Une seule parcelle d'ignames, en sous bois, éloignée des habitations a été visitée à Antobitilo. Des ignames de moindre importance (*D. bulbifera*, *D. sansibarensis*), pouvant servir occasionnellement d'appoint alimentaire ou médicinal, ont souvent été observées sur le bord des routes à l'état spontané, leur caractère bulbifère favorisant leur dissémination naturelle.

Trois espèces d'ignames cultivées ont été collectées : *D. alata* (24), *D. bulbifera* (5) et *D. esculenta* (10) et deux espèces spontanées : *D. minutiflora* (1) et *D. sansibarensis* (1)(tableau 1). Chez *D. alata*, quatre variétés ou morphotypes, Ovibe, Ovy lalaina et plus rarement Ovy vazaha et Ovy voay, ont été trouvées. Les deux morphotypes de *D. bulbifera* (bulbilles sphériques ou anguleuses), ont été trouvés, et uniquement un seul pour *D. esculenta*.

### Symptomatologie

Hormis chez la plante MT 312 pour laquelle des symptômes typiques de mosaïques ont été observés, aucun symptôme typique et marqué de viroses n'a été observé sur l'essentiel des ignames rencontrés. Cependant, des enroulements suspects de feuilles (« leaf curl ») ont été régulièrement vus sur le morphotype Ovy lalaina (*D. alata*). De même, quelques symptômes faibles et douteux de mosaïque et de « leaf spot » ont également été trouvés sur quelques plantes de *D. bulbifera* et de *D. esculenta*. D'un point de vue global, l'état sanitaire des plants d'ignames semblait excellent.

### *Détection des virus*

Les résultats de l'analyse par PCR et RT-PCR des échantillons collectés sont présentés dans le tableau 1. Les analyses n'ont pas permis de détecter dans les échantillons de CMV, d'YMV ni de potexvirus (en particulier DLV). En revanche, YMMV a été trouvé sur une seule plante (*D. alata* var. Ovy tanty acc. MT 312) présentant des symptômes de mosaïque typique et collectée à Miarinarivo, dans la région d'Ambalavao, au Sud-Est de Madagascar. De même, la moitié des plantes (21/41) ont révélés la présence de DBV. DBV a été détecté chez tous les échantillons de *D. bulbifera* (4/4), chez la quasi-totalité des échantillons de *D. esculenta* (9/10), et plus rarement chez les échantillons *D. alata* (7/24).

### *Caractérisation moléculaires des souches virales*

Afin de mieux la caractériser, la souche d'YMMV détectée sur MT 312 a été clonée et séquencée. La séquence obtenue, longue 516 pb après élimination des amorces, a été comparée par BlastN aux séquences de la Genbank (NCBI)(tableau 2). Celle-ci n'a pas trouvé d'équivalence parfaite avec d'autres séquences connues et présente, au mieux, 93 % d'identité avec la séquence AJ305458 d'une souche d'YMMV trouvée sur une plante *D. alata* du Vanouatou. Une telle différence révèle la mise en évidence d'une nouvelle souche d'YMMV.

Treize séquences de DBV, de tailles allant de 521 à 528 pb, ont été obtenues (tableau 2) à partir des produits d'amplification générés sur sept plantes infectées par DBV. Elles ont été comparées par BlastN aux séquences virales disponibles sur la Genebank (NCBI). Au final, dix séquences distinctes ont été trouvées et sont réparties dans six groupes sur les treize déjà répertoriés par Kenyon et al (2008). Certaines plantes (MDG 002, MDG 027, MT 274) sont même porteuses de trois souches appartenant à 3 groupes génétiques différents. Malgré le faible nombre d'échantillons et de séquences virales obtenues, aucune structuration entre souche virale et espèce d'igname n'est, à première vue, visible. Ainsi, la souche DBV grp 1, semblent pouvoir infecter indifféremment les 3 espèces d'ignames. Par contre, les souches DBV grp 4 et DBV grp 11 se trouvent uniquement chez *D. bulbifera* et *D. esculenta*, et les souches DBV grp 3 et DBV grp 13 uniquement chez *D. alata*.

## **Discussion**

### *Lien entre symptômes et virus détectés*

Les tests RT-PCR ont bien confirmés la présence d'YMMV dans la plante MT 312 pour laquelle des symptômes typiques de mosaïques ont été observés. En revanche, DBV est réputé

pour ne pas générer de symptômes prononcés et, malgré la relative abondance de plantes infectées par ce virus, il est difficile sans expérimentations supplémentaires, notamment inoculation sur plante saine, d'en attribuer les symptômes en « leaf spot ». Par ailleurs, les enroulements de feuilles (« leaf curl ») observés notamment sur le morphotype Ovy lalaina (*D. alata*) est caractéristique des virus de la famille des géminiviridae et des bégomovirus, en particulier. La réalisation de tests de détection spécifiques des géminiviridae pourraient permettre de conclure sur l'origine virale du symptôme ou, au contraire, confirmer l'hypothèse d'une caractéristique propre à la variété.

### *Hypothèse sur l'origine géographique des virus*

C'est la première fois, à notre connaissance, que DBV et YMMV sont mis en évidence à Madagascar. La caractérisation des différentes souches virales identifiées a permis, chez les deux espèces de virus, d'identifier des souches originales non répertoriées à ce jour. YMMV ne révèle à ce jour qu'une souche proche d'une souche trouvée au Vanoutou en Mélanésie (Munford et al, non publié). DBV est particulièrement bien représenté puisque six groupes sur les treize connus y sont représentés et, pour l'essentiel des séquences, leur similitude les rapproche de souches déjà identifiées en Mélanésie par Kenyon et al (2008). Seules les souches appartenant au groupe 4 se singularisent et ne montrent pas de similitude forte avec les autres souches de son groupe. La question de leur origine est posée.

Bousalem et al (2003) et Bousalem et al (2009), en se basant sur les données de séquences nucléotidiques des virus des ignames, font l'hypothèse d'une migration (avec leur virus) des ignames asiatiques, d'Est en Ouest, depuis l'Asie du Sud-Est vers l'Afrique et Madagascar puis vers le continent américain, au gré des migrations de populations (par exemple, peuplement de Madagascar par les peuples indonésiens au premier millénaire) ou du commerce des navigateurs européens à partir du 16<sup>ème</sup> siècle. Une telle hypothèse semble tout à fait conforme avec nos résultats puisque l'essentiel des souches virales des espèces YMMV et DBV trouve leur origine en Mélanésie.

### *Risques de diffusion dus aux vecteurs et pratiques humaines*

Aucune cochenille, vecteur du DBV (badnavirus), ni puceron, vecteur des potyvirus (YMMV et YMV), n'ont été observés, ce qui pourrait limiter le risque de transmission de ces virus par insecte sur courte ou longue distance. En revanche, la présence en abondance d'aleurodes, vecteur de l'African cassava mosaic virus (ACMV, bégomovirus), sur les plants de manioc (*Manihot esculenta*) présentant de très forts symptômes de mosaïque et de rabougrissement, a été observée. Compte tenu du caractère émergent et virulent de cette maladie, il n'est pas interdit de penser que les ignames puissent, un jour, être infectées accidentellement par une forme d'ACMV et il convient d'être vigilant sur ce point.

Par ailleurs, le mode de culture extensif des ignames, à proximité des cases ou en sous bois, tel que l'on a pu l'observer, est destiné en grande partie à l'autoconsommation ou ponctuellement à une commercialisation locale (Penche, 2008). Parce qu'il n'y a pas réellement multiplication de matériel végétal potentiellement malade mais uniquement replantation ou maintien de la souche, cette pratique est a priori peu propice à la diffusion des variétés et par voie de conséquence des maladies, notamment virales. Il n'en est pas de même des initiatives visant à

la multiplication et la diffusion de matériel à grande échelle où une seule plante infectée pourrait suffire à générer des épidémies.

### *Diversité faible des variétés et risque virale important*

La diversité relativement faible des variétés au sein de chacune des espèces représentées (Rajaonah et al, 2010) accroît le risque de voir se propager les maladies et parasites, en particulier les viroses, surtout si les initiatives actuelles de développement de la culture d'ignames au niveau national se poursuivent. Accroître l'offre variétale par l'introduction de variétés exotiques, tolérantes aux virus notamment, peut être une réponse à ce risque.

### *Implication pour la lutte contre les viroses*

Cette étude préliminaire a permis de mettre en évidence la présence de deux espèces de virus spécifiques des espèces d'ignames cultivées. Cependant, les connaissances actuelles, indiquent que ces virus peuvent impacter de façon très contrastée le rendement de la culture.

DBV semble beaucoup plus fréquent et variable génétiquement et infecte les 3 espèces testées. Cependant, compte tenu des connaissances déjà acquises sur cette espèce virale, il n'y a pas réellement lieu de craindre d'effet sur le rendement. Il n'a jamais été démontré d'effet négatif du DBV sur le rendement. En revanche, il convient d'être beaucoup plus prudent en ce qui concerne YMMV et tous les potyvirus, en général. La prévalence d'YMMV semble actuellement très faible à Madagascar, et il n'a vraisemblablement pas actuellement d'impact sur les cultures d'ignames, mais est potentiellement problématique chez *D. alata*. Pour cela, la vigilance doit être impérativement maintenue pour le contenir voire l'éradiquer, d'autant plus qu'une dynamique d'expansion de la culture est actuellement en cours. Tant que le nombre de plantes virosées est extrêmement faible à l'échelle de parcelles paysannes ou de pépinières, la destruction des plantes symptomatiques (mosaïques, distorsions foliaires, rabougrissements) doit être encouragée, voire systématiquement entreprise.

A l'échelle paysanne, la destruction immédiate des plants est, sans aucun doute, difficile à admettre pour un paysan. Une alternative plus réaliste consistera, à la récolte, à détruire le pied et à ne pas utiliser les tubercules récoltés pour replantation, mais uniquement les employer pour un usage alimentaire. De même, lorsqu'une plantation est entreprise, seuls les tubercules de belle taille et issus de plantes asymptomatiques devront être sélectionnés, éventuellement fragmentés et plantés.

A l'échelle régionale, la création de pépinière de production de matériel sain et indexé peut aussi être développée pour multiplier et diffuser les variétés élités. Pour cela, la sélection des plantes-mères avant toute multiplication (par miniset ou par culture *in vitro*) et diffusion dans le pays doit être minutieusement entreprise, en choisissant les plantes asymptomatiques et en les indexant régulièrement selon, par exemple, les techniques de détection décrites précédemment. L'isolement des pépinières et l'absence de parcelles de production d'ignames non contrôlées à leur proximité est impératif. L'utilisation de serre-ombrières insect-proof pourrait également limiter le risque de piqures et contaminations par les insectes telles que les pucerons, cochenilles, cicadelles et aleurodes, vecteurs de virus.

A l'échelle nationale, l'importation de matériel exotique, visant à enrichir et diversifier la gamme variétale d'ignames, afin d'accroître la qualité des tubercules et de limiter les effets des pathogènes, doit faire l'objet de contrôles sanitaires stricts. Elle doit passer par un schéma de quarantaine mettant en œuvre des observations symptomatologiques et des tests de diagnostics visant à écarter les plantes infectées ou douteuses.

## Conclusion

Ces premiers résultats, bien que fragmentaires, informent déjà sur la présence de deux espèces de virus chez les ignames cultivées de Madagascar. YMMV, susceptible d'infecter particulièrement l'espèce *D. alata*, est encore rare, mais doit faire l'objet d'un suivi tout particulier compte tenu des risques qu'il peut engendrer sur les baisses de production. Cela implique la mise en place en amont de mesures de sélections sanitaires avant toute diffusion de matériel végétal vers des zones indemnes de Madagascar. Plus largement, l'importation de matériel exotique doit aussi faire l'objet de contrôle sanitaire, et, idéalement, passer par un schéma de quarantaine.

## Références bibliographiques

Bousalem, M., Dallot, S., Fuji, S. et Natsuaki, K.T., 2003. Origin, world-wide dispersion, biogeographical diversification, radiation and recombination : an evolutionary history of Yam mild mosaic virus (YMMV). *Infection, Genetics and Evolution*, 3, 189-206.

Bousalem, M., Durand, O., Scarcelli, N., Lebas, B.S.M., Kenyon L, Marchand, J.L., Lefort, F. et Seal, S.E., 2009. Dilemmas caused by endogenous pararetroviruses regarding the taxonomy and diagnosis of yam (*Dioscorea* spp.) badnaviruses : analyses to support safe germplasm movement. *Archives of Virology*, 154, 297-314.

Brunt, A.A., Jackson, G.V.H. et Frison, E.A. (eds.), 1989. FAO/IBPGR Technical guidelines for the safe movement of yam germplasm. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome/ International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 20 p. Website: [www.ipgri.cgiar.org/publications/pubfile.asp?ID\\_PUB=504](http://www.ipgri.cgiar.org/publications/pubfile.asp?ID_PUB=504).

Filloux, D. et Girard, J-C., 2006. Indexing and elimination of viruses infecting yams (*Dioscorea* spp.) for the safe movement of germplasm. *Proceedings 14th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops*, 20-26 November, Trivandrum, India.

Kenyon, L., Lebas, B.S.M. et Seal, S.E., 2008. Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific Islands contain many novel badnaviruses : implications for international movement of yam germplasm. *Archives of Virology*, 153, 877-889.

Marie-Jeanne, V., Ioos, R., Peyre, J., Alliot, B. et Signoret, P., 2000. Differentiation of poaceae potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. *Journal of Phytopathology*, 148, 141-151.

Mumford, R.A. et Seal, S.E., 1997. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. *Journal of Virological Methods*, 69, 73-79.



Penche, A., 2008. L'igname sur la côte Est de Madagascar : plante du passé ou culture d'avenir ? Diagnostic agraire dans la commune de Ranomafana-Est. Mémoire de fin d'études ESAT 1, IRC – SupAgro, Montpellier, 104 p.

Rajaonah, M.T., Chair, H., Rodier, M. et Filloux, D., Jeannoda V., 2010. Caractérisation génétique et virale des ignames cultivées de Madagascar. Poster : 19ème congrès de l'AETFAT "Diversité des plantes africaines, systématique et développement durable", 25-30 avril 2010, Antananarivo, Madagascar.

Seal, S., et Muller, E., 2007. Molecular analysis of a full-length sequence of a new yam badnavirus from *Dioscorea sansibarensis*. Archives of Virology, 152, 819–825.

Thouvenel, J.C. et Dumont, R., 1990. Perte de rendement de l'igname infectée par le virus de la mosaïque en Côte-d'Ivoire. L'Agronomie Tropicale, 45, 125-129.

van der Vlugt, A.A. et Berendsen, M., 2002. Development of a general potexvirus detection method. European Journal of Plant Pathology, 108, 367-371.

**Tableau 1 : Recherche de virus infectant les ignames malgaches : identités et résultats d'analyse par PCR et RT-PCR des échantillons collectés.**

Numéro échantillon	Espèce	Variété	Lieu de collecte	Symptômes	YMMV	YMV	Potyvirus	Badnavirus	Potexvirus	CMV
MDG 001	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lalaina	Route N2 - Ambohimiarina - Jardin de case paysan 1		-	-	-	-	-	-
MDG 002	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Route N2 - Ambohimiarina - Jardin de case paysan 1		-	-	-	+++	-	-
MDG 003	<i>Dioscorea alata</i>	Ovibe	Route N2 - Ambohimiarina - Jardin de case paysan 1		-	-	-	+	-	-
MDG 004	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lalaina	Route N2 - Ambohimiarina - Jardin de case paysan 1	Leaf curl ?	-	-	-	-	-	-
MDG 005	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Route N2 - Ambohimiarina - Jardin de case paysan 2		-	-	-	+++	-	-
MDG 006	<i>Dioscorea alata</i>	Ovibe	Route N2 - Ambohimiarina - Jardin de case paysan 2		-	-	-	-	-	-
MDG 009	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy vazaha	Route N2 - Antobitilo - Parcelle paysanne		-	-	-	+	-	-
MDG 010	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy vazaha	Route N2 - Antobitilo - Parcelle paysanne		-	-	-	+	-	-
MDG 011	<i>Dioscorea alata</i>	Ovibe	Route N2 - Antobitilo - Parcelle paysanne		-	-	-	-	-	-
MDG 013	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Route N11 - Ambalamangahazo - Jardin de case paysan		-	-	-	++	-	-
MDG 014	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Route N11 - Ambalamangahazo - Jardin de case paysan		-	-	-	++	-	-
MDG 015	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Route N11 - Ambalamangahazo - Jardin de case paysan		-	-	-	-	-	-
MDG 016	<i>Dioscorea alata</i>	Ovibe	Route N11 - Ambalamangahazo - Jardin de case paysan		-	-	-	-	-	-
MDG 017	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Route N11 - Ambalamangahazo - Jardin de case paysan		-	-	-	++	-	-
MDG 018	<i>Dioscorea bulbifera</i>	Hofika	Route N11 - Ambalamangahazo - Jardin de case paysan	Leaf spot ?	-	-	-	+++	-	-
MDG 019	<i>Dioscorea bulbifera</i>	Hofika	Route N11 - Ambalamangahazo - Jardin de case paysan	Leaf spot ?	-	-	-	+++	-	-
MDG 020	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lalaina	Route N11 - Ampanasana - Jardin de case paysan		-	-	-	-	-	-
MDG 021	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lalaina	Route N11 - Ampanasana - Jardin de case paysan		-	-	-	-	-	-
MDG 022	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy voay	Route N11 - Ampanasana - Jardin de case paysan		-	-	-	-	-	-
MDG 023	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Route N11 - Ampanasana - Jardin de case paysan		-	-	-	++	-	-
MDG 024	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy vazaha	Route N11 - Ampanasana - Jardin de case paysan		-	-	-	-	-	-
MDG 025	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Route N11 - Ampanasana - Jardin de case paysan		-	-	-	++	-	-
MDG 027	<i>Dioscorea bulbifera</i>	Hofika	Route N11 - Lieu dit "I2%" - Mahanoro - Bord de route		-	-	-	+++	-	-
MDG 028	<i>Dioscorea bulbifera</i>	Hofika	Route N11 - Lieu dit "I2%" - Mahanoro - Bord de route		-	-	-	+++	-	-
MDG 029	<i>Dioscorea sansibarensis</i>		Route N11 - Avant Mahanoro - Bord de route		-	-	-	-	-	-
MDG 030	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lalaina	Route N11 - Mahanoro - Centre-ville		-	-	-	-	-	-
MDG 031	<i>Dioscorea minutiflora</i>		Route N11 - Mahanoro - Centre-ville		-	-	-	-	-	-
MDG 032	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lalaina	Andovoranto - Jardin de case paysan		-	-	-	-	-	-
MDG 033	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lalaina	Andovoranto - Jardin de case paysan	Mosaïque ?	-	-	-	-	-	-
MDG 034	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lalaina	Andovoranto - Jardin de case paysan	Leaf curl ?	-	-	-	-	-	-

MDG 035	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Andovoranto - Jardin de case paysan	Distorsion foliaire, leaf spot	-	-	-	+++	-	-
MDG 036	<i>Dioscorea esculenta</i>	Mavondro	Andovoranto - Jardin de case paysan	Distorsion foliaire, leaf spot	-	-	-	+	-	-
MDG 039	<i>Dioscorea bulbifera</i>	Hofika	Andovoranto - Bord de route	Mosaïque ?	-	-	-	+++	-	-
MDG 040	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lalaina	Andovoranto - Bord de route	Leaf curl, mosaïque ?	-	-	-	-	-	-
MT 238	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy vazaha	Ambohimirina		-	-	-	-	-	-
MT 248	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy mena na Ovy lalaina	Nierenana Ambinanitelo		-	-	-	-	-	-
MT 260	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lohendambo	Fanasana Ambodihazoambo		-	-	-	-	-	-
MT 271	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy lava	Anivorano Abeovihazo		-	-	-	++	-	-
MT 274	<i>Dioscorea alata</i>	Ovibe	Anivorano Abeovihazo		-	-	-	+	-	-
MT 300	<i>Dioscorea alata</i>	Randromiendaka	Ambatofotsy -Ikongo		-	-	-	+	-	-
MT 312	<i>Dioscorea alata</i>	Ovy tanty	Miarinarivo-Ambalavao	Mosaïque, distorsion foliaire	+++	-	+++	+	-	-

Légende : virus faiblement (+), moyennement (++), fortement (+++) ou pas détecté (-)

**Tableau 2** : Liste et caractérisation des séquences virales obtenues dans les différentes espèces d'ignames

Plante	Espèce	Variété	Espèce virale identifiée	Longueur séquence (nt)	Recherche NCBI		
					Accession (n° GenBank)	Identité	Origine
MT 312	<i>D. alata</i>	Ovy tanty	YMMV	516	Van1Da (AJ305458)	93 %	Vanouatou
MT 274	<i>D. alata</i>	Ovibe	DBV grp 1 *	528	PG102dDa (AM072675)	99 %	Papouasie - Nouvelle Guinée
			DBV grp 3	528	PG102aDa (AM072674)	99 %	Papouasie - Nouvelle Guinée
			DBV grp 13	521	PG102cDa (AM421690)	95 %	Papouasie - Nouvelle Guinée
MDG 002	<i>D. esculenta</i>	Mavondro	DBV grp 1	528	PG110aDe (AM072676)	89 %	Papouasie - Nouvelle Guinée
			DBV grp 1	528	SB47c_De (AM072698)	89 %	Iles Salomon
			DBV grp 11	528	FJ75b_De (AM072662)	100 %	Fidji
MDG 009	<i>D. alata</i>	Ovy vazaha	DBV grp 13	522	PG102cDa (AM421690)	99 %	Papouasie - Nouvelle Guinée
MDG 018	<i>D. bulbifera</i>	Hofika	DBV grp 4	528	B39-4_Ds (DQ822073)	84%	Bénin
MDG 023	<i>D. esculenta</i>	Mavondro	DBV grp 4	528	B39-4_Ds (DQ822073)	84%	Bénin
MDG 027	<i>D. bulbifera</i>	Hofika	DBV grp 1	528	SB47c_De (AM072698)	99 %	Iles Salomon
			DBV grp 2	528	SB47b_De (AM072697)	100 %	Iles Salomon
			DBV grp 11	528	FJ75b_De (AM072662)	100 %	Fidji
MDG 035	<i>D. esculenta</i>	Mavondro	DBV grp 1	528	SB47c_De (AM072698)	89 %	Iles Salomon

\* D'après la classification de DBV proposée par Kenyon et al (2008)